

Géncsendesítéssel a vírusok ellen

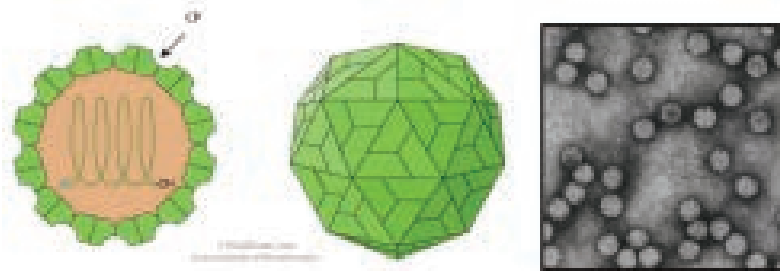
ÍRTA | KONTRA LEVENTE PhD hallgató, DR. CSORBA TIBOR tudományos munkatárs – Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ, Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet, Gödöllő
SOROZATSZERKESZTŐ | DR. FEHÉR ATTILA tudományos tanácsadó

A törzsfelődés során a növényekben többféle védekezési stratégia fejlődött ki a kórokozók támadásaival szemben. A vírusok, a baktériumok és a gombák támadásának kivédésére RNS-, illetve fehérjealapú védelmi rendszerek alakultak ki. Cikkünk izgalmas kutatási területekről, a növényeknek a vírusokkal szembeni RNS alapú védekezéséről, illetve a vírusoknak az ezzel szembeni önvédelmük fortélyaiból ad ízelítőt.



Avírusok a legkisebb, ismert mikroorganizmusok; tulajdonságaik az élő és élettelen anyagra egyaránt jellemzők. Egymagukban ugyan nem mutatnak életjelenségeket, és szaporodásra csak élő sejtekben képesek. A teljes vírust az örökítőanyag (deoxiribonukleinsav a DNS-vírusokban, vagy ribonukleinsav az RNS-vírusokban) és az ezt körülvevő fehérjeburok alkotja (1. ábra).

A gazdasajtbe jutva a vírusok átprogramozzák a sejt anyagcsere-folyamatait elszaporodásuk érdekében. Mindez a gazdasajt/szervezet rendellenes működésére, betegségek kialakulására vezethet. A kórokozók által okozott betegségek leküzdése ellen a gazdaszervezetek számos védekezési stratégiát fejlesztettek ki. Egyik ilyen válaszreakció az RNS-csendesítés (RNS silencing vagy RNS-interferencia, RNSi), amely szekvensspecifikus, RNS-lebontó folyamat. A növényekben az RNS-csendesítés kiemelkedően fontos szerepű a vírusokkal szembeni védekezésben (lásd *TermészetBúvár* 2014/5. szám, a *Vírusok a biológia szolgálatában* című cikk).



1. ábra A növényeket fertőző tobacsvírusok felépítése és elektronmikroszkópos képe. A fehérjeegységekből álló köpeny (coat protein, CP) védi a virális RNS-t, amely a vírus szaporodásához szükséges információt kódolja
FOTÓ | VIRALZONE.COM, VIDE DATABASE



2. ábra Lila festékanyag termeléséért felelős gént juttattak be mesterségesen petúniákba. A mesterségesen bevitt génről íródott hírvívó RNS beindította a bevitt gén, a növény saját (endogén) génjének csendesítését (együttes csendesítést, azaz ko-szuppresszióját). A fehér szektorokban beindul az RNS csendesítés, míg a sötét szektorokban nem (illusztráció)

és Baulcombe egy évvel később kimutatta, hogy jellegzetes 21–25 nukleotidhosszúságú, kisméretű RNS-ek felhalmozódása kíséri a folyamatot. A RNS-csendesítés mechanizmusának fonálférgekben való feltárásáért Fire és Mello 2006-ban orvosi Nobel-díjat kapott. Bár a növényekben dolgozó kutatók úttörő munkát végeztek ezen a területen, kimaradtak ebből az elismerésből.

TUDTA-E?

A növényekben, gombákban és az alacsonyrendű állatokban az RNS-csendesítés az alapvető vírusellenes mechanizmus. Emlősök esetén azonban a fehérje alapú, természetes és adaptív immunválasz sokkal nagyobb jelentőségű a vírusok elleni védekezésben. Emlősejtben a dupla szálú RNS elsősorban az interferonrendszert aktiválja, amely azután elősegíti a szervezet antivirális válaszána kialakulását. Más esetekben viszont, például az emlősök multipotens sejtjeiben (összejteiben), amelyekben nincs működőképes interferonválasz, az RNS-interferencia jut aktív szerephez.

MEGLEPŐ VÁLTOZÁS

Az RNS-csendesítés jelenségét a 1990-es évek elején, növényeken figyelték meg először egy szerencsés véletlen folytán. A kísérletso-rozatban *Napoli* és munkatársai a petúnia lila színét szerették volna még sötétebbé tenni genetikai módosítás révén. A petúniának a lila színanyag termelésért felelős génjét vitték be a növénybe még egy példányban, hogy az ezáltal több színanyagot termeljen. Még a kutatókat is meglepte, hogy az intenzívebb színű virágok helyett szektorosan, vagy teljesen kiféhéredett virágokat kaptak (2. ábra). A jelenséget azzal magyarázták, hogy miközben a növény a mesterségesen bevitt gén működésével szemben védekezett, az azzal teljesen megegyező DNS-szekvenciájú saját gén termelését is elnyomta („szuppresszálta”). Ezt a jelenséget ko-szuppressziónak nevezték el.

Egy másik tanulmányban (1995-ben) arról számoltak be, hogy ha víusból származó szekvenciákat fejeztettek ki (juttattak érvényre) növényekben, ezek elvesztették fogékonyságukat az adott és közeli rokon kórokozóval szemben (úgynevezett keresztvédettség alakult ki). Itt is hasonló mechanizmus működött, mint a petúnia esetében: a bejuttatott víusbénnel együtt a növény a fertőző vírusok azonos vagy nagyon hasonló szekvenciájú génjeit is kikapcsolta, „elcsendesítette”.

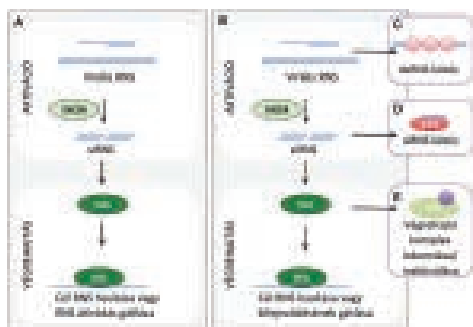
Ezeknek a RNS-csendesítési jelenségeknek a molekuláris háttere akkor kezdett el körvonalazódni, amikor egyrészt A. Fire és C. Mello 1998-ban felismerte, hogy a dupla szálú RNS-ek (lásd a keretes anyagot) aktiválják az RNS-csendesítést, másrészt Hamilton

TUDTA-E?

Az RNS-molekulák többsége egyetlen nukleotidszálból áll., azonban az RNS is képes kialakítani a DNS-re jellemző kettős spirálformát. Ehhez arra van szükség, hogy az összekapcsolódó, két RNS-szál nukleotidsorrendje egymásnak komplementere legyen (hasnolón a DNS két szálához). Ez azt jelenti, hogy az egyik nukleotidlánc bázisai sorra megtalálják a párjukat a másik láncban. A DNS esetében az összekapcsolódó bázispárok az adenin és a timin (A:T) illetve a guanin és a citozin (G:C), míg az RNS esetében annyi a különbség, hogy a timin helyett uracil (U) szerepel. Kétszálú RNS struktúra kialakulhat két RNS molekula között (intermolekulárisan) vagy egyazon RNS két régiója között (intramolekulárisan) is. A növények RNS-alapú védekezési rendszerét a virális RNS kettős régiók/szálak aktiválják (lásd alább).

ŐSI MECHANIZMUS

A későbbi kutatásokból kiderült, hogy az RNS-csendesítés minden magasabb rendű, eukarióta szervezetben meglévő, ősi mechanizmus. Az RNSi korai szerepe feltételezhetően a vírusok elleni védekezés volt. Az is egyértelművé vált, hogy az RNSi nemcsak az idegen



3. ábra Az RNS csendesítés folyamata (A). A virális szuppresszorok az antivirális RNS csendesítés aktivációs vagy végrehajtó szakaszát gátolják (B). A vírus szuppresszor burkolja a virális eredetű dsRNS régiókat és ezáltal megakadályozza a DICER enzim működését (C), míg a siRNS-ek megkötésével a duplaszál elhasítása ugyan nem gátolt, az effektor komplex programozása viszont igen (D). A szuppresszor kötődik a végrehajtó komplex effektorához és annak lebontását vagy aktivitásának gátlását okozza (E)

TUDTA-E?

A vírusokkal szembeni védekezés szakaszosan alakul ki.

1. **Aktiváció:** az RNSi-t a vírusokról keletkező, dupla szálú (ds) RNS-molekulák jelenléte aktiválja. A dsRNS-molekulákat a DICER nevű enzimszálalag valamelyik tagja (a dicing angol szó, jelentése szeletelés) ismeri fel, és jellegzetes, 21–24 nukleotid hosszúságú, kis RNS-ekké (angolul: small interfering RNA, rövidítve siRNS) darabolja. A 21–24 nukleotid hosszúságú siRNS-ek az RNS-csengesítés kulcsmolekulái (3A. ábra).

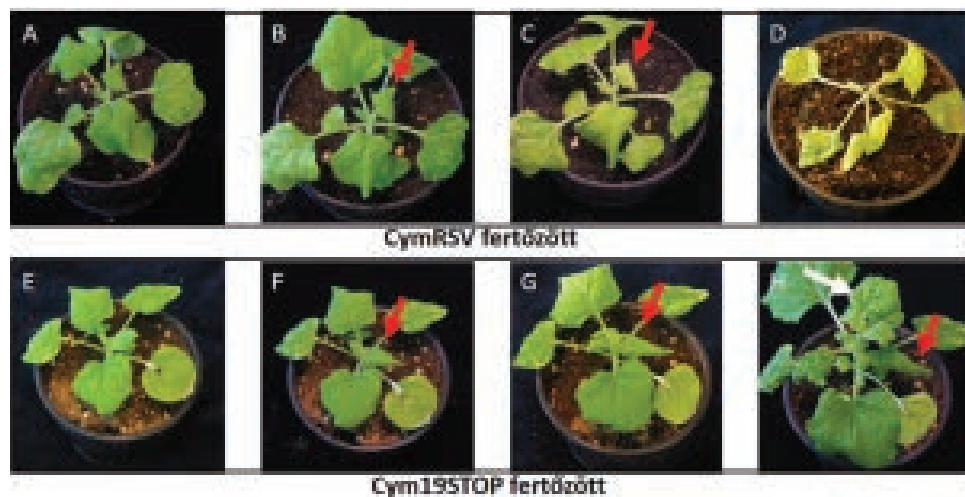
2. **Végrehajtás:** a siRNS-ek egyik szála beépül egy fehérje végrehajtó komplexbe (angolul RNA-Induced Silencing Complex, röviden RISC). A RISC-komplex a későbbiekben felismer és hasít vagy működésében gátol minden olyan RNS-t, amely a beépült siRNS szállal komplementer régiót tartalmaz (3A. ábra).

eredetű RNS-ek ellen működik hatékonyan, hanem a legtöbb élőlény saját génszabályozásában, például az egyedfejlődési folyamatok vagy a gének kifejeződésének térbeli és időbeli irányításában is.

A vírusok az RNS-csengesítés leküzdése érdekében válaszstratégiákat „dolgoztak ki” a gazda-parazita ko-evolúciós folyamat során. Közülük az egyik olyan virális fehérjék termelésével jár, amelyek az RNSi-válasz valamelyik lépését gátolni képesek (3B. ábra). Ezeket virális szuppresszoroknak nevezzük. A tombusvírusok esetében például a vírusgenom által kódolt p19 nevű szuppresszor, mint egy molekuláris tolmácsoló, képes méretük alapján, felismerni és megkötni a 21–24 nukleotid hosszúságú siRNS-molekulákat (3D. ábra). Ennek az a következménye, hogy nincs szabad siRNS, amely a RISC-komplexbe beépülhetne, hogy ezáltal az antivirális válasz végrehajtó lépése megvalósuljon (3A. és B. ábra).

A vad típusú tombusvírusokkal fertőzött

4. ábra Az RNS szuppresszor hatása a vírus tünetek kialakulására. *Nicotiana benthamiana* teszt-növények vad típusú tombusvírussal (CymRSV) (A–D), illetve a géncsengesítést gátolni nem képes mutáns vírussal (Cym19STOP) (E–H) való fertőzése és a vírustünet alakulás folyamata 3, 5, 7, illetve 10 nappal a fertőzést követően. Ha a vírus (Cym19STOP) nem képes az RNS csengesítést gátló p19 fehérjét termeltetni, a növény védekező mechanizmusa idővel visszazsorítja a vírust és a növény kigyógyul (E–H), a vad típusú vírussal fertőzött növény ellenben elpusztul (A–D). Piros nyilak a vírustüneteket mutató leveleket, a fehér nyíl a kigyógyult leveleket jelzik
FOTÓK | KONTRA LEVENTE



Nicotiana benthamiana (dohányfaj) teszt-növény a kórokozó bejutását követően néhány napon belül elpusztul (4. ábra, A–D), mivel a vírus által termelt p19 jelenlétében az antivirális válasz már az aktivációs fázisban elakad (3B. ábra). Ha viszont a vírus nem kódolja a p19 szuppresszort (p19 fehérje termelésében mutáns vírus), az antivirális RNS-csengesítés képes visszazsorítani a vírus szaporodását, és a növény kigyógyul (4. ábra, E–H). Mindez bizonyíték arra, hogy a vírus szuppresszora valóban hatékonyan gátolja a növény védelmi rendszerét.

TÖBBFÉLE GÁTLÁS

Számos hatékony, ettől eltérő szuppresszorstratégia ismeretes. Ilyen például a dsRNS-kötés. Ennek során a virális szuppresszor a dsRNS-t burkolja, és ezáltal akadályozza a siRNS-érést (3C. ábra). A gátlás másik módja a RISC fő komponensének a hatástalanítása. A vírusszuppresszor ilyenkor megköti a végrehajtó fehérjét, és megjelöli a lebontó útvonalak számára, vagy gátolja a végrehajtó aktivitását (3E. ábra).

RNSi-technológiával számos vírussal szemben ellenálló, gazdasági haszonnövényt sikerült létrehozni

A leírt példától eltérően, amelyben gyenge védekezési rendszerű teszt-növény szerepelt, a természetben előforduló legtöbb gazda-vírus kapcsolatban az RNS-csengesítés és ennek vírusszuppresszor általi gátlása egyensúlyba kerül. Ez teszi lehetővé a vírus hatékony szaporodását és terjedését, de ugyanakkor a gazdaszervezet túlélését is, amely elengedhetetlen a vírus számára. A növényvirológiai kutatások lényegesen hozzájárultak az RNSi biokémiájának feltáráshoz, és a növény-vírus kapcsolat jobb megértéséhez. Lehetővé tették a mechanizmus biotechnológiai hasznosítását, vírusoknak ellenálló növények előállítását. RNSi-technológiával számos vírussal szemben ellenálló, gazdasági haszonnövényt (rizst, burgonyát, paradicsomot, babot, dohányt stb.) sikerült létrehozni. Az RNSi-technológiával előállított növények termesztésbe vonásával nagy károkat lehetne megelőzni, miközben a mezőgazdasági termelés hatékonysága is növekszik.

